

花生总蛋白N-糖链的质谱分析研究

李玲梅, 刘向慧

洛阳师范学院食品与药品学院, 河南 洛阳

Email: 0701106038@163.com

收稿日期: 2020年11月2日; 录用日期: 2020年11月16日; 发布日期: 2020年11月23日

摘要

本研究以花生为实验材料, 释放花生蛋白N-糖链, 并对花生蛋白N-糖链进行质谱分析, 从而对花生蛋白进行深入研究。结果表明, 花生总蛋白含有10条蛋白条带, 并在花生总蛋白中检测到10条糖链, 其糖链结构组成为 H_8N_2 , H_9N_2 , H_3N_2 , H_3N_2Xyl , H_4N_2 , $H_3N_2FucXyl$, H_4N_2Xyl , H_5N_2 , H_6N_2 , H_7N_2 。这10条糖链均为N-糖链, 且均为中性糖。本文对花生总蛋白N-糖链进行质谱分析, 对花生蛋白N-糖链的研究具有重要意义。

关键词

花生蛋白, 糖蛋白, N-糖链, 质谱分析

N-Glycan Analysis of Peanut Total Protein by Mass Spectrometry

Lingmei Li, Xianghui Liu

College of Food and Drug, Luoyang Normal University, Luoyang Henan

Email: 0701106038@163.com

Received: Nov. 2nd, 2020; accepted: Nov. 16th, 2020; published: Nov. 23rd, 2020

Abstract

In this study, peanut was selected as the experimental material to release peanut protein N-glycan, and the N-glycan of peanut protein was analyzed by mass spectrometry, so as to conduct an in-depth study on peanut protein. The results showed that peanut total protein contained 10 protein bands and 10 glycan were detected in peanut total protein. The glycan was composed of H_8N_2 , H_9N_2 , H_3N_2 , H_3N_2Xyl , H_4N_2 , $H_3N_2FucXyl$, H_4N_2Xyl , H_5N_2 , H_6N_2 , and H_7N_2 . These 10 glycan all N-glycan,

文章引用: 李玲梅, 刘向慧. 花生总蛋白 N-糖链的质谱分析研究[J]. 食品与营养科学, 2020, 9(4): 296-302.

DOI: 10.12677/hjfn.2020.94039

and they are all neutral glycan. In this paper, the total peanut protein *N*-glycan was analyzed by mass spectrometry, which is of great significance to the study of peanut protein *N*-glycan.

Keywords

Peanut Protein, Glycoprotein, *N*-Glycan, Mass Spectrometry Analysis

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

目前,花生是我国乃至全球种植最广泛的经济作物之一[1]。花生蛋白中球蛋白约占90%,水溶性清蛋白约占10%,球蛋白又包含花生球蛋白和伴花生球蛋白[2],花生蛋白的营养价值高且富含多种人体必需氨基酸[3]。花生蛋白具有乳化性、吸油性、吸水性、凝胶性等重要功能性质,是一种常用食品基料,花生蛋白中各自功能特性的蛋白材料可在不同类型的食品中应用[4]。但是,花生蛋白也是我们日常生活中一种非常重要的过敏原[5]。目前,已被发现的花生过敏原蛋白就有11种,其中有2种是主要过敏原,分别是Ara h1和Ara h2[6],而鸡蛋中的主要过敏蛋白为卵黏蛋白和卵白蛋白[7]。研究发现,致敏蛋白大都是*N*-糖基化蛋白,且*N*-糖链在过敏中起着重要作用。因此,研究花生蛋白中的*N*-糖链对研究花生蛋白致敏有着非常重要的作用。

首先,对大豆蛋白的*N*-糖链进行释放。目前,常用酶法和化学法两种方法来对*N*-糖链进行释放。酶法中常用的酶分苷糖酶和蛋白酶两种,其中苷糖酶可特异性作用于苷糖键,且苷糖酶分为内切苷糖酶和外切苷糖酶,而蛋白酶则是选择性地水解肽链,形成含有糖链的肽段。化学释放法则是主要选择胍解法,需要在90℃且无水的条件下反应4h,反应条件较酶法更苛刻且不安全,所以化学法应用并不广泛[8]。

然后,对收集的*N*-糖链进行纯化。常用的糖链纯化方法有反向色谱法、正向色谱法、层析法、化学捕获法,离子交换色谱法、高效液相色谱法。本文中所用的方法为反向色谱法,因为糖链的亲水度高,在反向柱中不易保留可以直接从反向柱中穿透出来,以达到纯化糖链的目的。所用的反向柱有C18和C8固相萃取小柱[9]。

最后,糖链的分离分析方法。糖链的分离分析方法有电泳法、液相色谱法、质谱法。电泳法是通过高压直流电场驱动带有电荷的样品移动,进而实现分离的,它可以在一定程度上分离纯化糖蛋白糖链,并且可以得到相关的结构信息,具有效率高,消耗样品少等特点[10]。液相色谱被广泛应用于糖链的制备、分离、纯化等研究,液相检测器一般是紫外检测器,检测前需要把糖链进行柱前衍生,如果液相装备有蒸发光散射检测器可直接检测分析没有荧光吸收的糖链。主要用于电离糖链的质谱法有电喷雾电离质谱和基质辅助激光解析电离质谱两种。

本实验选择花生作为实验材料,释放花生蛋白糖链,并对花生蛋白糖连进行质谱分析,为今后开发低致敏性花生蛋白制品提供依据,对花生蛋白致敏性研究具有重要的意义。

2. 材料与仪器

2.1. 实验材料与试剂

新鲜干燥红皮花生购于超市;透析袋(截留分子量8000~14,000 KDa)购于Union Carbide Co.公司;磷

酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾、盐酸购于天津天力公司; Acr (丙烯酰胺)、Bis (甲叉双丙烯酰胺)、Tris (三羟甲基氨基甲烷)、SDS (烷基硫酸钠)、DTT (二硫苏糖醇)、溴酚蓝、TEMED (四甲基乙二胺)、AP (过硫酸铵)、PMP (1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮)均购于 Aladdin 公司; 蔗糖、考马斯 G-250、甘氨酸均购于普利化工有限公司; 丙酮、甲醇、氨水、二氯甲烷、冰乙酸、乙腈等均为国产分析纯。

2.2. 仪器与设备

FMS 型粉碎机(台湾弘荃机械有限公司); DF-101S 型恒温磁力搅拌(郑州生化仪器有限公司); PHS-3C 型 PH 计(上海仪电科学仪器有限公司); Scientz-18N 型冷冻干燥机(宁波新芝生物科技有限公司); DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂); Premium HA 125 SM 型电子天平(天美公司); Sigma 3-18KS 型高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); YPD-300D 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); 7020-03 型 C18 固相萃取柱(北京化标源科技有限公司); SCIEX X500R QTOF 型质谱仪(AB SCIEX 公司)。

3. 实验方法

不要使用空格、制表符设置段落缩进, 不要通过连续的回车符(换行符)调整段间距。

3.1. 花生蛋白的提取

花生去皮于粉碎机中粉碎, 花生粉末和丙酮 1:10 (m/v)的比例, 在烧杯中添加丙酮和花生粉末, 烧杯用保鲜膜包裹在 4℃ 搅拌两小时, 搅拌速度为 300 rpm, 静置弃去上清液, 反复脱脂至上清液澄清, 5000 r/min 离心 30 min 得到沉淀, 将沉淀置于通风橱中晾干, 得到脱脂粉末。配置 PBS 缓冲液(取磷酸二氢钾 0.24 g, 磷酸氢二钠 1.44 g, 氯化钠 8 g, 氯化钾 0.2 g, 加去离子水 800 mL 充分溶解, 然后加浓盐酸调至 7.4, 最后定容至 1000 mL), 按花生脱脂粉末和 PBS 缓冲液 1:7 (m/v)的比例, 在烧杯中添加花生脱脂粉末和 PBS 缓冲液, 于 4℃ 搅拌 24 小时, 搅拌速度为 300 rpm, 静置取上清液, 4℃ 下 5000 r/min 离心 30 min, 收集所得上清液。使用 pH 计校准液校准 pH 计后, 加盐酸将收集到的上清液 PH 调至 4.55 边调 PH 边搅拌, 使沉淀完全后, 4℃ 下 5000 r/min 离心 30 min, 收集沉淀, 将沉淀用适量水溶解后装进活化好的透析袋, 置于装满水的烧杯中透析 48 h 期间需多次换水, 透析好后将透析液倒进培养皿中, 置于冰箱中冷冻, 待完全冻住后, 将培养皿放在冷冻干燥机中冻干 24 h 即可得到花生蛋白粗品, 粗品需 -20℃ 保存。

3.2. SDS-PAGE 电泳鉴定蛋白

配置 SDS-PAGE 电泳所需溶液: 30%分离胶贮液(取 Acr 30 g, Bis 0.8 g, 定容至 100 mL), 浓缩胶贮液(取 Acr 10 g, Bis 0.5 g, 定容至 100 mL), 分离胶缓冲液(取 Tris 36.3 g 水溶, 调 pH 8.8, 定容至 100 mL), 浓缩胶缓冲液(Tris 6.0 g 水溶, 调 pH 6.8, 定容至 100 mL), 上样缓冲液(SDS 1 g, DTT 1 g, 溴酚蓝 20 mg, 蔗糖 40 g, 0.25 M 且 pH 为 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液 20 mL, 定容至 1000 ml), G-250 染色液(1 g 考马斯 G-250, 182 mL 甲醇, 182 mL 蒸馏水, 36 mL 冰乙酸), 电极缓冲液(Tris 0.15 g, 甘氨酸 0.72 g, SDS 0.025 g, 定容至 250 mL)配好后放置 4℃ 冷藏。

固定好电泳玻璃板后检漏, 配置 10%SDS, 10%AP, 分离胶(分离胶贮液 8 mL, 分离胶缓冲液 2.5 mL, 10% SDS 0.2 mL, 10% AP 0.1 mL, 蒸馏水 9.18 mL, TEMED 0.02 mL), 充分混匀后注胶并水封。分离胶凝结后, 配浓缩胶(浓缩胶贮液 3 mL, 浓缩胶缓冲液 1.25 mL, 10%SDS 0.1 mL, 10% AP 0.05 mL, TEMED 0.02 mL), 充分混匀后加浓缩胶并插入样梳。称取样品 5 mg, 加 0.5 mL 上样缓冲液, 溶解后在 100 °C 水中加热 10 min, 浓缩胶凝结后, 向槽内倒入电泳缓冲液, 拔出样梳, 每孔内加样 10 μL, 接通电源, 稳压 120 V 进入分离胶后, 电压改为 90 V。电泳结束后, 将凝胶板放在培养皿内, 倒入染色液, 染色 4 h, 染色完成后, 将胶片放于盛有水的烧杯中在 100 °C 水浴锅中加热 0.5 h, 可得到花生总蛋白胶片。

3.3. 花生蛋白糖链的提取

称取 1392 mg PMP, 样品 10 mg 于 4 mL 离心管中, 在通风橱中加入配置好的 50% 甲醇 - 氨水溶液(取 4 mL 离心管加入 2 mL 甲醇, 2 mL 氨水摇匀)至 4 mL, 震荡使样品溶解, 然后将离心管置于水浴锅中 80℃ 反应 48 h, 反应结束后, 取两个 4 mL 离心管每个离心管中分装样品 2 mL, 每个离心管中各加二氯甲烷 2 mL, 用二氯甲烷萃取, 分别取上清液于 4 mL 离心管中, 各用 200 μ L 移液枪加冰乙酸 20 滴震荡摇匀, 再加二氯甲烷加至 4 mL, 震荡摇匀后静置, 待有明显分层后, 取上清液于 1.5 mL 离心管中, 转速 5000 r/min 离心 30 min, 取上清液至烧瓶中用旋转蒸发仪蒸干, 再用 4 mL 蒸馏水溶解后, 分别加入 2 mL 至 4 mL 离心管中, 每个离心管中各加二氯甲烷 2 mL, 用二氯甲烷萃取, 分别取上清液于 4 mL 离心管中, 各用 200 μ L 移液枪加冰乙酸 20 滴震荡摇匀, 再加二氯甲烷加至 4 mL, 震荡摇匀后静置, 待有明显分层后, 吸取上清液至 1.5 mL 离心管中, 转速 5000 r/min 离心 30 min, 取上清液至烧瓶中用旋转蒸发仪蒸干, 蒸干后用 1 mL 蒸馏水溶出过 C18 柱(如果是新柱子先用 20% 乙腈洗 12 mL, 再用 25% 乙腈洗 12 mL, 再用蒸馏水洗 12 mL), 将溶解的 1 mL 样品上柱, 用蒸馏水洗 6 mL, 再用 25% 乙腈洗 3 mL, 干燥即得花生总蛋白 *N*-糖链样品[11]。

3.4. 糖链的质谱分析

取收集到的糖链样品, 用乙腈稀释样品后用一次性过滤器过滤, 设置进样量为 10 μ L, 用 ESI-MS 法进行分析。ESI-MS 参数: 离子源电喷雾质谱电压 4 KV, 鞘气 N₂ 流速 20.0 arb; 辅助气体 N₂ 流速为 10.0 arb, 毛细管温度 300℃, 毛细管电压 350 V, 毛细管透镜电压 250 V, 样品进样量为 10 μ L, 流动相为 50% 甲醇, 流速为 20 μ L/min。

4. 结果与分析

4.1. 花生总蛋白 SDS-PAGE 鉴定

如图 1 所示, 经过脱脂, 浸提, 等电点沉淀几个步骤后得到的花生蛋白含有 10 个条带, 条带非常明显的则含量较高, 条带不清晰的则含量较少。图中第一条蛋白带即为本实验的目标蛋白, 说明在花生总蛋白中, 该蛋白的含量较高。

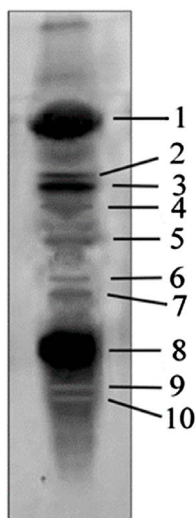


Figure 1. SDS-PAGE identification of total peanut protein

图 1. SDS-PAGE 鉴定花生总蛋白

4.2. N-糖链的质谱分析

如图2所示,花生总蛋白中检测到10条糖链,质谱峰 m/z 为:1045.42 $H_8N_2(PMP)_2$,1126.10 $H_9N_2(PMP)_2$,1263.58 $H_3N_2(PMP)_2$,1395.50 $H_3N_2Xyl(PMP)_2$,1425.50 $H_4N_2(PMP)_2$,1541.50 $H_3N_2FucXyl(PMP)_2$,1557.08 $H_4N_2Xyl(PMP)_2$,1587.08 $H_5N_2(PMP)_2$,1749.08 $H_6N_2(PMP)_2$,1911.67 $H_7N_2(PMP)_2$ 。其中 m/z 1045.42和1126.10为双电荷 $[M+H+K]^{2+}$ 型离子峰,其余各峰均为 $[M+Na]^+$ 型离子峰。

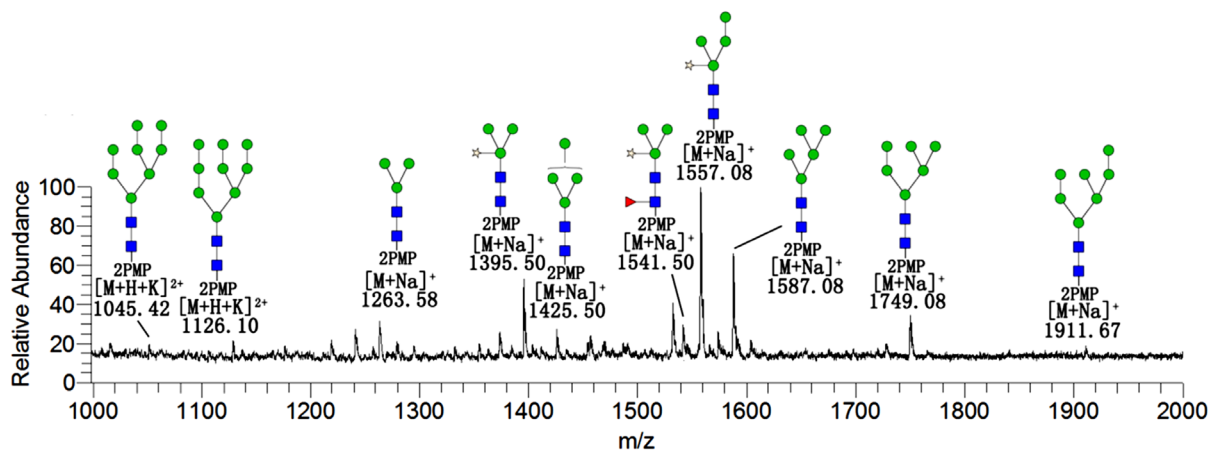


Figure 2. Analysis of protein glycan by mass spectrometry

图2. 蛋白糖链的质谱分析

4.3. N-糖链的相对定量分析

由图3可见,糖链的含量差别较大, H_4N_2Xyl 型糖链含量最高约为34%, H_5N_2 型糖链含量约为21%仅次于 H_4N_2Xyl 型糖链,而 H_7N_2 型糖链含量最少约为1%。 H_3N_2 型糖链, H_4N_2 型糖链和 $H_3N_2FucXyl$ 型糖链的含量较为接近。其中 H_3N_2Xyl 、 $H_3N_2FucXyl$ 糖链为复杂型(complex)糖链,占总糖链的20.1%; H_3N_2 糖链为核心型(core)五糖结构,占总糖链的6%; H_4N_2Xyl 糖链为杂合型(hybrid)糖链,占总糖链的34%;其它的糖链为高甘露糖(high-mannose)链,占总糖链的39.9%。如表1所示,表中包括了花生蛋白糖链的单糖组成(Monosaccharide composition)、质谱峰(m/z)、离子型(Ion)、糖结构(Proposed structure)及糖型(Type)。

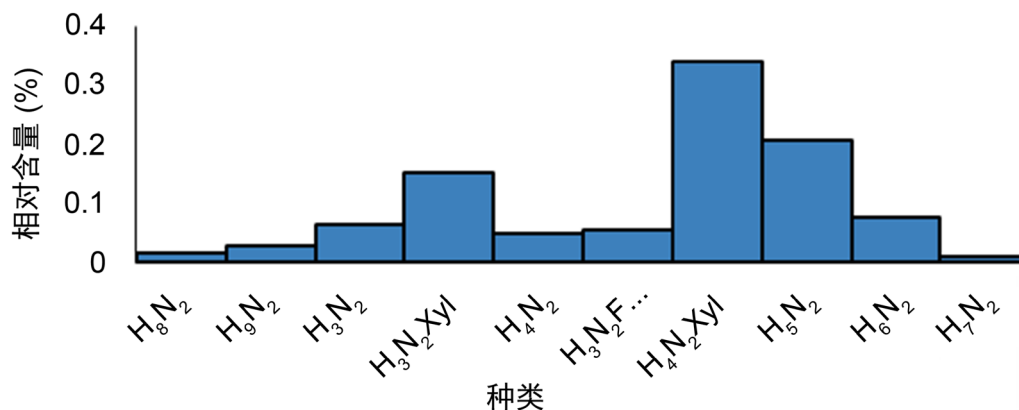


Figure 3. Relative quantitative analysis of protein N-glycan chain

图3. 蛋白N-糖链的相对定量分析

Table 1. Summary of monosaccharide composition, structure and sugar type of protein glycan
表 1. 蛋白糖链的单糖组成、结构和糖型总结

| Monosaccharide composition | m/z | Ion | Proposed structure | Type |
|------------------------------------|---------|-----------------------|--------------------|--------------|
| H ₃ N ₂ | 1241.58 | [M+H] ⁺ | | core |
| | 1263.33 | [M+Na] ⁺ | | |
| | 1279.08 | [M+K] ⁺ | | |
| H ₃ N ₂ X1 | 1373.42 | [M+H] ⁺ | | complex |
| | 1395.42 | [M+Na] ⁺ | | |
| H ₄ N ₂ | 1425.42 | [M+Na] ⁺ | | high-mannose |
| H ₃ N ₂ F1X1 | 1541.33 | [M+Na] ⁺ | | complex |
| H ₄ N ₂ X1 | 1557.42 | [M+Na] ⁺ | | hybrid |
| H ₅ N ₂ | 1587.42 | [M+Na] ⁺ | | high-mannose |
| H ₆ N ₂ | 1749.50 | [M+Na] ⁺ | | high-mannose |
| H ₇ N ₂ | 1911.42 | [M+Na] ⁺ | | high-mannose |
| H ₈ N ₂ | 1045.37 | [M+H+K] ²⁺ | | high-mannose |
| H ₉ N ₂ | 1126.08 | [M+H+K] ²⁺ | | high-mannose |

5. 结论

实验以花生为材料, 通过脱脂, 浸提, 等电点沉淀得到花生蛋白, 通过 SDS-PAGE 电泳得到花生蛋白含有 10 条蛋白带。提取花生蛋白糖链后, 用 ESI-MS 法解析了花生蛋白糖链的组成及相对含量, 花生蛋白共含有 10 条糖链, 其糖组分别为: H₈N₂ (2%), H₉N₂ (3%), H₃N₂ (6%), H₃N₂Xyl (15%), H₄N₂ (4.9%), H₃N₂FucXyl (5.1), H₄N₂Xyl (34%), H₅N₂ (21%), H₆N₂ (8%), H₇N₂ (1%)。这 10 条糖链均为 N-糖链, 且均为中性糖。

基金项目

2018 年洛阳师范学院国家级项目培育基金项目(No. 2018-PYJJ-006)的项目支持。

参考文献

- [1] 赵晓燕, 孙秀平, 陈锋亮, 等. 花生蛋白的研究进展与开发利用现状[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(12): 118-122.
- [2] 董新红, 赵谋明, 蒋跃明. 花生蛋白改性的研究进展[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(12): 109-117.
- [3] 坤耀. 我国花生蛋白质的研究概况[J]. 广东农业科学, 2004(z1): 15-16.
- [4] 王颖佳, 章绍兵, 刘汝慧, 等. 花生蛋白及其组分乳化性质的研究[J]. 食品科技, 2019, 44(4): 261-266.

- [5] 何伟逸, 冯玥, 蒋聪利, 等. 花生过敏及其主要致敏原 Ara h1 的研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(6): 571-575.
- [6] 韩远龙, 吴志华, 李璞, 等. 花生过敏原结构及加工研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 310-315.
- [7] 丛艳君, 薛文通, 张惠, 等. 加工方式和蛋白提取方法对花生蛋白致敏性的影响[J]. 食品科学, 2007(11): 207-210.
- [8] 彭艺芳. 花生致敏糖蛋白 Ara h1 糖链决定簇的质谱分析[D]: [硕士学位论文]. 西安: 西北大学, 2016.
- [9] 袁江北. 糖蛋白的 N-糖链的化学法释放新方法研究[D]: [硕士学位论文]. 西安: 西北大学, 2014.
- [10] 张小倩, 张腾腾, 闫攀, 等. 蛋白 N-糖基化分析方法研究进展[J]. 生物技术进展, 2019, 9(3): 246-252.
- [11] Yuan, J.B., Wang, C.J., Sun, Y.J., Huang, L.J. and Wang, Z.F. (2014) Nonreductive Chemical Release of Intact N-Glycans for Subsequent Labeling and Analysis by Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*, **462**, 1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.05.029>